Sireptococcus に対する Malachitegreen-fuchsin 分別染色について

室 橋 豊 穂 吉 田 幸 之 助

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

(受付: 9月1日・1959年)

*E. coli*¹⁾, *staphylococcus*²⁾, *mycobacteria*^{3,4)}の何れも、多少宛染色手技を変えれば、malachitegreen と fuchsin とを用いる染色方法によつて、緑或は赤に菌体が分別染色されること、それらの Viability が緑に染まる菌体数の多少と直接関連する如く見えることなどを既に報告しこの分別染色性が、抗酸性や Gram 染色性などとは無関係に、性質を異にするそれらの各細菌群に共通な生物学的意義を持つことを述べた。Gram 陽性菌の一つである *Streptococcus* は長い連鎖を作るが、その場合にも、その連鎖を構成する個々の菌体細胞には Vitality の差があると考えられ、その差異を恐らくはこの分別染色によつて或る程度迄知りうるであろうと思われる。

同じく Gram 陽性菌と云つても、酵素による細胞融解の面からみれば⁵⁾, *Streptococcus* は *B. subtilis* や *Staphylococcus* とは著しく性質を異にし、恐らくは一層鞏固な細胞壁構造を持つように推察される。従つて、*E. coli*, *Staphylococcus* 及び *Mycobacteria* の間における、同様の染色効果を挙げる為の染色方法の違いを想い起せば、*Streptococcus* に対しても亦当然染色手技上の考慮が払われなければならぬ筈である。そこで、*Streptococcus group-A typ-12*を用いて前処置に用いる tannin 酸濃度を種々に変えて染色を試みたところ、緑と赤とに染め分けられた菌体を連鎖の中に明確に識別することが出来た。その分別染色の意味づけについて考察しようと思う。

実験方法並びに成績

実験 I. 染色方法の検討。

E. coli や *Staphylococcus* について行つたと同様、まず前処理せずに染色を試みた。1% Malachitegreen と 10倍稀釈 Carbol-fuchsin とを以て二重に染色すると、常にかからの色素によつて凡ての菌体が一色に染められる。両色素の混合液で染めると、凡ての菌体が両色素を混合した紫色にそめられ、acetone 処理によつても分別

効果が見られない。この点は *E. coli* や *Staphylococcus* と全く同様である。

そこで、tannin 酸処理を行つてから染色することにした。tannin 酸濃度を 1, 0.5, 0.1, 0.05及び0.01%の5段階とし、乾燥、固定した塗抹標本に約5分間作用させた後、水洗せずに濾紙で吸湿、自然乾燥させた。之に10倍稀釈 Carbol-fuchsin を注いで2~3分高温で染色し水洗、吸湿、乾燥後、1~0.5% Malachitegreen を注いで約5分間染色し、水洗、吸湿、鏡検。

染色性に及ぼす tannin 酸濃度の影響をみると、濃度が高い程細胞壁が強く染まつて肥厚し、細胞が著しく膨大になつてみえる。そして、細胞質は何れも初めに用いた fuchsin によつて赤く染まり、細胞壁のみが緑黒色に染まつて、後から用いた Malachitegreen の細胞内浸入が妨げられているようにみえる。tannin 酸の濃度を減ずるに従い、細胞壁の染まり方は弱まり、細胞壁は厚みを減じて細胞の大きさは縮小する。0.01%になると、細胞の輪廓は明瞭乍ら、大きさは無処理の細胞の夫と略々等しく、Malachitegreen の細胞内浸入は容易となり、或るものは緑に、或るものは赤に染め分けられる。

このようにして、前処理に0.01%程度の稀薄な tannin 酸を用いれば、明確な分別染色を得ることを知つた。また、Malachitegreen の濃度は、染色時間を約5分とする場合に0.5%程度が分別効果もよく色調も美しい。

染色方法は次の如くである。

- 1) 塗抹、乾燥、火焰固定。
- 2) 0.01% tannin 酸を注ぎ約5分間放置。
- 3) 水洗せず、吸湿、乾燥。

MUROHASHI Toyoho & YOSHIDA Konosuke:
Differential staining of streptococcus by the malachitegreen-fuchsin method. Tuberculosis Division, National Institute of Health, Tokyo. Jap.J. of Bact. 15(3), 313-318, 1960.

4) 10倍稀釈 Carbol-fuchsin (pH 5.8) を注ぎ、2～3 分間染色。

5) 水洗，吸湿，乾燥。

6) 0.5% Malachitegreen (NaOH で pH 4.2～4.3 とする) を注ぎ約 5 分間染色。

7) 水洗，吸湿，鏡検。

実験Ⅱ 菌体細胞内 DNA の解重合或は除去に伴う分別染色性の変化。

方法：血液寒天斜面 24 時間培養菌を掻き取って、0.5 mg/ml 程度の菌液とし、塗抹標本を作つて乾燥，火焰固定。之等の標本に次の各処理を加えた後，実験Ⅰに記した方法で染色した。又，残りの菌液にも同様な操作を加えた後塗抹染色して，分別染色性をしらべた。

(1) n-HCl, 60°C, 30 分処理では，尚ほ僅か乍ら緑に染まる菌体が残存するが，80°C, 20 分処理を行うと，凡ての菌体が Malachitegreen 染色性を失つて pink にそまる。

(2) 10% trichlor 醋酸, 90°C, 15 分処理では，凡ての菌体が pink にそまる。

(3) 10% 過塩素酸, 90°C, 15 分処理では，(1)，

(2) と全く同様に，菌体は凡て pink にそまる。然し

表 1 Streptococcus の分別染色性に及ぼす前処理の影響 (24 時間培養菌)

染色前の処理	菌体のそまり	
	green	pink
非処理	+++	++
n-HCl; 60°C, 30 分	+	+++
n-HCl; 80°C, 20 分	—	+++
10% trichlor 醋酸, 90°C, 15 分	—	+++
10% 過塩素酸, 90°C, 15 分	—	+++
10% 過塩素酸, 0-5°C, 24 時	++	++
蒸溜水, 0-5°C, 24 時	++	++
6 倍 formalin; 60 分 → n-HCl, 60°C, 3 分 → 水 60°C, 60 分	++	+++

0～5°C で処理すると，24 時間後においても蒸溜水対照と全く同様の分別染色を呈する。

(4) 6 倍 formalin 水 60 分固定後，n-HCl, 60°C, 3 分，次で温水 60°C, 60 分処理を行うと，殆んど凡ての菌体が pink にそまるようになるが，僅か乍ら緑にそまる菌体も残存する。

表 2 E₂ 斜面培地培養菌の新，旧，菌体分別染色性並びに viability の関係

培養後 保存日数		n ₁ 計 数			n ₀ 計 数			緑染菌 α (%)	実測集落数 VU	recoverability*	
		$\sum_{i=1}^{20} n_1$	n ₁	推定菌数 N ₁	$\sum_{i=1}^{20} n_0$	n ₀	推定緑菌数 N ₀			β ₁	β ₂
0	1	98	4.90	9.8×10 ⁵	67	3.35	6.7×10 ⁵	68	6×10 ⁵	0.61	0.88
	2	140	7.00	14.0×10 ⁵	90	4.50	9.0×10 ⁵	64	59×10 ⁴	0.42	0.65
	3	176	8.80	17.6×10 ⁵	90	4.50	9.0×10 ⁵	46	10×10 ⁵	0.56	1.11
	4	136	6.80	13.6×10 ⁵	91	4.55	9.1×10 ⁵	67	104×10 ⁴	0.76	1.15
	5	158	7.90	15.8×10 ⁵	72	3.60	7.2×10 ⁵	46	4×10 ⁵	0.25	0.55
	6	104	5.20	10.4×10 ⁵	69	3.45	6.9×10 ⁵	66	4×10 ⁵	0.38	0.58
30	1	121	6.35	12.7×10 ⁵	37	1.85	3.7×10 ⁵	29	16×10 ³	0.012	0.043
	2	181	9.05	18.1×10 ⁵	28	1.40	2.8×10 ⁵	15	12×10 ³	0.0066	0.043
	3	194	9.70	19.4×10 ⁵	42	2.10	4.2×10 ⁵	22	11×10 ³	0.0056	0.026
	4	227	11.35	22.7×10 ⁵	37	1.85	3.7×10 ⁵	16	15×10 ³	0.0066	0.040
	5	186	9.30	18.6×10 ⁵	32	1.60	3.2×10 ⁵	17	15×10 ³	0.0080	0.046
120	1	85	4.25	8.5×10 ⁵	19	0.95	1.9×10 ⁵	20	2×10 ²	0.0002	0.001
	2	72	3.60	7.2×10 ⁵	7	0.32	7.0×10 ⁴	10	1×10 ¹	0.00001	0.0001
	3	112	5.60	11.2×10 ⁵	5	0.25	5.0×10 ⁴	4	2×10 ²	0.0001	0.004
	4	81	4.05	8.1×10 ⁵	9	0.45	9.0×10 ⁴	11	1×10 ²	0.0001	0.001
	5	79	3.95	7.9×10 ⁵	6	0.30	6.0×10 ⁴	8	1×10 ²	0.0001	0.001
	6	44	2.20	4.4×10 ⁵	4	0.20	4.0×10 ⁴	9	3×10 ²	0.0007	0.007

*: β = VU/N

成績を表1に一括した。この所見は *Mycobacteria*, *E. coli*. 及び *Staphylococcus* におけると全く同様で、分別染色の機序が菌体細胞内DNAの重合度と密接な関連をもつことを示している。

実験Ⅲ. 斜面培地培養菌の分別染色性と Viability との関連：

方法：1) 定量培養用培地：*Streptococcus* の viability 測定には血液寒天培地、Todd-Hewitt 寒天培地及び glycerin 寒天培地の何れも用いる訳であるが、前2者は調製に手間を要する難点があり、又、後者は集落発育が悪く小形で計数の容易でないことが多い。そこで、別に報告したように⁹⁾、Todd-Hewitt 液体培地組成から塩類を除いた極めて組成の簡単な寒天平板培地 (E_s 培地と仮称) を作り、之に定量培養することにした。この培地では、24時間後肉眼で容易に集落を計数することが出来る。

2) 菌液： E_s -寒天斜面培養の菌を掻き取り、およそ 1 mg/ml になる如く蒸留水に浮遊させ、3,000 rpm, 5分、長い連鎖や大きい菌塊を沈澱除去した上清を実験に用いた。この1白金耳を塗抹染色してみると、主として単個菌から成るが、3~5個程度の短い連鎖を多少は含んでいる。この菌液を蒸留水で10段階階稀釈し、夫々の 0.1 ml ずつを前記 E_s 培地に表面培養して、24時間後の発生集落数を数え、0.1ml 中の Viability を定めた。

3) 菌数の推定法：菌液 0.1 ml 中の菌数推定は、前報告^{1,2,7)}と同じく次のように行つた。

菌液の1白金耳(内径約 3 mm, 太さ 0.7 mm)を直径約12mmの円形に塗抹し、分別染色を施した後、at random の20視野を拡大率 900~1000倍で鏡検、分別染色された菌数を数えて1視野平均菌数 (n_1) 及び、同緑染菌数 (n_0) を算出。次の推定式を用いて 0.1 ml 中の推定総菌数 (N_1) 及び同総緑染菌数 (N_0) 算出した。

$$N_1 = 2 \cdot 10^5 \cdot n_1 : N_0 = 2 \cdot 10^5 \cdot n_0$$

この場合、完全な単個菌々液には勿論なっていないので、他の菌の場合とはやや異なるが、単個菌からでも1つの連鎖からでも1集落を生ずるものと仮定して、連鎖を常に1個と数えることにした。特に n_0 計数の場合には、緑染菌体を1個含む場合も1個以上含む場合も共に緑染菌1個と数えた。従つて、Malachitegreen-fuchsin法による菌体細胞の分別染色の比率は正確には計算されえないが、近似的にその割合を知ることは可能である。

本実験に用いた培養は、 E_s 培地斜面24時間培養(新)24時間培養後高温保存1ヵ月(旧-I)及び3.5ヵ月(旧-II)の3種である。成績は表2に示した。

まず菌体の染色性についてみると、Malachitegreen に染まる菌体の割合 (α) は培養の新、旧によつて著しく相違し、24時間培養では約60%、旧-Iでは約20%、旧-IIでは約12%の示均値で、培養の古い程 Malachitegreen 染色性を持つ菌体の減少が著しく認められる。

実測集落数(VU)も、培養の古い程明かに少くなり、Viability と Malachitegreen 染色性との間に密接な関連のあることを示しており、一応 Viable な菌は Malachitegreen 染色性を持つと云いるのであろう。

但しこの場合、実測値は培地に接種された菌数の多少によつて左右されるので、比較の爲には、実測値と推定菌数との比から recoverability (β) を算出して比較すべきであろう。表に掲げたように、総菌数 N_1 及び緑染菌数 N_0 からの recoverability β_1 及び β_2 は、共に培養の新らしい程値が大きく、保存日数が増すにつれて著しく低下している。培養後保存時間の函数としての recoverability の推移については稿を改めて検討するが、その値から明

図1 *Streptococcus* の Viability, 菌体分別染色並びに recoverability の関係

らかなように、陳旧培養菌では、接種された菌数の内極めて僅かなものしか集落を形成しえない訳である。

1 視野平均菌数と実測による Viability との関連を見る為に、実測値を推定グラフに plot すると図1の如くである。新培養では recoverability 100% (又は 1.0) の推定直線に略々近接して分布し、特に緑染菌数 (n_0) を数えた方が緑染菌、赤痢菌の双方を混えて数えた場合 (n_1) よりも、推定直線に近く分布し、Viable 且つ recoverable な菌は Malachitegreen 染色性を持つことを示している。之に対して保存日数を経た陳旧菌においては総菌数を数える場合には実測値は推定直線の遙か下方に分布し、緑染菌数 (n_0) のみを数えた場合に初めて推定直線に大幅に近づいて分布する。即ち、Mycobacteria E. coli, Staphylococcus の凡てにおけると全く同一の傾向が見られるのであり、新培養菌では緑にそまる菌から高率に集落形成が行われることがわかる。そして培養が古くなると緑に染まり乍ら培地上で recover しえない菌の割合が著しく増加することをこの成績は示している。

実験Ⅳ. 蒸溜水菌液保存に伴う染色性の変化と Viability の関連：

方法：E₈培地斜面24時間培養菌を掻き取り、1 mg/ml 程度の蒸溜水菌液として試験管に分注し、7本宛を87°C及び0~5°Cに保存。24時間毎に試験管1本宛をとり出し、3,000 rpm, 5分間遠沈して略々単独菌のみから成る菌液をつくり、実験Ⅲと全く同様にして菌の染色性と

図2 Streptococcus (Group-A) 蒸溜水菌液保存に伴う Stainability と Viability の推移 (37°C)

Viability とをしらべた。染色性については、各材料毎に2枚宛塗抹標本をつくり、Malachitegreen-fuchsin 染色及び Gram 染色を施して、その推移を観察した。成績は表3及び図2、3の如くである。

表3 蒸溜水菌液保存に伴う Streptococcus Group-A type-12 の染色性と viability の推移

菌液保存条件		Malachitegreen-fuchsin 染色					Gram 染色			実測集落数 VU
		$\sum_{i=1}^{20} n_1$	N_1	$\sum_{i=1}^{20} n_0$	N_0	α (%)	$\sum_{i=1}^{20} n_1'$	$\sum_{i=1}^{20} n_1' (+)$	Gram (+) %	
直	後	136	13.6×10^5	91	9.1×10^5	66.8	124	110	88.9	104×10^4
37°C	24時	119	11.9×10^5	90	9.0×10^5	75.6	125	114	91.2	10×10^4
	48	167	16.7×10^5	17	1.7×10^5	10.1	122	109	89.3	10×10^1
	72	124	12.4×10^5	10	1.0×10^5	8.0	234	222	94.8	2×10^0
	96	150	15.0×10^5	4	4.0×10^4	2.6	143	123	86.0	2×10^0
	120	181	18.1×10^5	1	1.0×10^4	0.5	169	143	84.6	1×10^0
	168	109	10.9×10^5	2	2.0×10^4	1.8	69	25	36.1	0
0~5°C	24時	137	13.7×10^5	107	10.7×10^5	78.1	173	167	96.5	20×10^4
	48	108	10.8×10^5	46	4.6×10^5	42.6	160	153	95.6	20×10^3
	72	117	11.7×10^5	38	3.8×10^5	32.0	282	276	97.8	39×10^1
	96	123	12.3×10^5	31	3.1×10^5	25.2	115	101	87.8	17×10^0
	120	172	17.2×10^5	15	1.5×10^5	8.7	226	200	88.4	4×10^0
	168	117	11.7×10^5	11	1.1×10^5	9.4	147	66	44.8	1×10^0

図3 Streptococcus (Group-A) 図蒸溜
水菌液保存に伴う Stainability と
viability の推移 (0~5°C)

緑染菌数の割合 (α) は 37°C 保存の場合に極めて急速に減少し、72時間以後 10% 以下となるが、0~5°C 保存では遅れて 120時間以後始めて 10% 以下を示した。之に対して Gram 染色性は両保存条件共殆んど差がなく、168時間後に至りようやく Gram 陰性を呈する菌体が半数を越えるようになった。Staphylococcus について述べたと全く同様に、Malachitegreen 染色性と Gram 染色性とはその染色機序を異にすることがわかる。

Viability の推移をみると、両保存条件において、共にその低下は極めて急激で、37°C 保存の場合 48時間後に、又 0~5°C 保存では之より僅かに遅れるが 72時間後には既に夫々 10^4 order を示し、菌体の Malachitegreen 染色性喪失よりも遙かに急速に Viability の減少がおこることがわかる。之に対して Gram 染色性は前述したように、Viability の減少とは直接関連を持たない。

総括・考察

Streptococcus は既に報告した酵素による細胞融解の面からみると、他の Gram 陽性菌とは著しく異つた鞏固な細胞壁構造を持つように想像されるので、染色条件を Staphylococcus の場合と多少変えて、同様な分別染色を得る可否かを検討した。その結果、前処理に用いる tannin 酸の濃度を 0.01% とすればその目的を達しう

ることを知った。その場合、新鮮培養菌では長い連鎖の所々に pink に染まる菌体が認められて美しく、培養の古くなるに伴つて、pink にそまる菌体が増加する。このような菌体の Malachitegreen 染色性は菌体細胞内 DNA の解重合や除去によつて失われるので、他の細菌群において考察した同じ染色機序が考えられる。

tannin 酸処理については、細胞外側に tannin 酸の薄膜が作られると想定しているが、菌体固有の細胞膜と tannin 酸の薄膜との重なりから成る複合膜が、或る一定度以下の大きさの粒子のみしか通過せしめない程度の大きさの孔を備えていると考えられるように思う。E. coli が 1% の、又 Staphylococcus が 0.5% の tannin 酸で夫々前処理を受けたときに同様な美しい分別染色を呈することや、加熱死菌に対する酵素の作用がそれらの菌の間で著しく異つていた点から、固有の細胞壁構造が細菌群毎に著しく相違し、夫々異つた大きさの孔を持つと推察するに難しくない。そう考えると、同じ染色効果をあげる為に必要な tannin 酸濃度が細菌毎に異なることは、その付加によつて細胞壁の孔の大きさを或る一定の大きさに調節する補助膜の厚さを意味すると考えることも可能のように思われる。

分別染色性と viability との関連は、新鮮培養菌の成績から、Malachitegreen 染色性と viability とが高い相関々係に在ることを示している。但し培養が古くなると Malachitegreen 染色性の喪失に比して集落形成率が著しく低下し、同数の緑染菌数からの recoveribility が培養の新、旧によつて著しく異なるが、このことは、菌体の Malachitegreen 染色性が菌の死に遅れて現はれることを意味するものであろう。

以上の実験により、Malachitegreen-fuchsin 法による Streptococcus 菌体の分別染色の意義は、他の既報の細菌類におけると全く同様であると結論してよいと思う。即ち、fuchsin によつて pink にそまる菌体は non-viable であるが、viable な菌体は Malachitegreen によつて緑にそまると考えるのである。之に対して Gram 染色性は菌の vitality とは直接の関連を持たぬように思われる。

結論

Streptococcus group-A type-12 を用いて菌体の Malachitegreen-fuchsin 法による分別染色性をしらべた。前処理に用いる tannin 酸濃度を 0.01% とすると他の細菌類と全く同様に分別染色される。菌体の Malachitegreen 染色性と Viability とはよく相関し、この染色性は DNA 解重合或は除去操作によつて失われる。

従つて、他の細菌類と全く同様に、viable な菌は緑に
そまるが、pink にそまる菌は死菌であると考えることが出来る。

文 献

- 1) 室橋豊穂, 吉田幸之助: 日本細菌学雑誌, 14(4)
285-289, 1959; 同誌, 14(5), 379-382, 1959.
- 2) 室橋豊穂, 吉田幸之助: 日本細菌学雑誌, 14(9)
738-742, 1959.
- 3) 室橋豊穂, 吉田幸之助: 結核研究の進歩, 17, 160
-172, 1957.
- 4) 室橋豊穂, 吉田幸之助, 土持隆彦: 医学と生物学,
46, 184-186, 1958.
- 5) 室橋豊穂, 関又蔵: 日本細菌学雑誌, 13(6), 501
-506, 1958.
- 6) 室橋豊穂, 吉田幸之助, 松矢徳太郎: 医学と生物
学, 53(1), 29-33, 1959.
- 7) 室橋豊穂, 吉田幸之助: 結核, 33, 95-98, 293-
297, 1958.